

**Determinación de la calidad biológica del
semen congelado de la unidad de ganado
lechero y doble propósito en Zamorano,
Honduras**

Bolívar Antonio González Granda

Andrea Karina Muñoz Molina

ZAMORANO

**Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Agosto, 2002**

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción
Agropecuaria

**Determinación de la calidad biológica del
semen congelado de la unidad de ganado
lechero y doble propósito en Zamorano,
Honduras**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
académico de Licenciatura

presentado por

Bolívar Antonio González Granda
Andrea Karina Muñoz Molina

Zamorano, Honduras
Agosto, 2002

Los autores conceden a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor

Bolívar Antonio González Granda

Andrea Karina Muñoz Molina

Zamorano, Honduras
Agosto, 2002

**Determinación de la calidad biológica del semen congelado
de la unidad de ganado lechero y doble propósito en
Zamorano, Honduras**

presentado por

Bolívar Antonio González Granda
Andrea Karina Muñoz Molina

Aprobada:

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor Principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Coordinador del Área
Temática de Zootecnia

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A
Coordinador de la Carrera de
Ciencia y Producción
Agropecuaria

Miguel Vélez, Ph.D.
Coordinador PIA

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Mario Contreras, Ph.D.
Director Ejecutivo

DEDICATORIA
B.A.G.G.

A Dios por haberme permitido llegar al final de esta etapa de mi vida.

A mis padres, Bolívar González Sotomayor y Albita Granda, por su apoyo incondicional para la culminación de esta etapa de mi vida.

A mis hermanos, Efrén, Paolita y Andrés, por su apoyo en todo momento; a mis abuelitos Alejo (Q.E.P.D.), Lolita, Polivio, Carmencita, por sus buenos consejos y por haber depositado toda su confianza en mí.

A toda mi Familia, tías, tíos, primos y primas que me brindaron su apoyo moral durante mi estancia en Honduras.

A María Eugenia, por su amor y su familia por el gran apoyo durante mi estancia en Honduras.

DEDICATORIA
A.K.M.M

A mi Dios por ser mi torre fuerte cuando el camino fue difícil y por haber hecho posible un sueño que en el principio parecía imposible.

A mis padres, Rosario Molina y Héctor Muñoz, mis mejores ejemplos de trabajo, sacrificio y amor.

A mis hermanos, Yadira y Cristian, por su confianza y apoyo en los momentos difíciles y por ser los mejores hermanos que Dios me puedo dar.

AGRADECIMIENTOS

B.A.G.G.

Al Dr. Isidro Matamoros, por darme la oportunidad y confianza dentro del Proyecto Leche Zamorano-USAID.

A mis Asesores por brindarme su apoyo y asesoría durante la realización de mi proyecto especial.

A mi compañera Andrea por ser una buena amiga.

A mis amigos, Wladimir, Mikold, Darwin, José, Vinicio, Darwin M, Sergio, Danny, Carlos, Ana, Nora, María Cristina, Gabriela, Mónica, por su amistad y compañerismo durante mis años de estudio.

A Zamorano, y todo su personal por brindarme la oportunidad de aprender haciendo.

AGRADECIMIENTOS

A.K.M.M

A mis padres por su confianza, apoyo y sacrificio, Dios los bendiga.

Al Doc. Hincapié y Doc. Matamoros por toda la ayuda y asesoría brindada para la realización de este proyecto especial.

A todo mi familia, quienes aportaron su granito de arena para que ésta carrera sea posible.

A Bolívar, por ser más que un compañero un amigo, gracias por tus consejos, apoyo y sinceridad.

A las familias Caballero y Acosta-Caballero por haberme brindado su cariño, ayuda y por ser como mi familia en Honduras.

A Carolina Rivas por su amistad incondicional y sus consejos desde la distancia, gracias amiga.

A Nora Lagos y Gabriela Santos por su cariño, amistad, consejos, apoyo y buenos momentos compartidos.

A Susana Sierra, Ana Posas, Mariela Medina y José Ernesto por todos los momentos compartidos y su sincera amistad.

A Daniel, Allan y Raúl por su apoyo y amistad que nació de la nada.

Al Dr. Keith Andrews, porque sus palabras durante mi primer año fortalecieron mi espíritu de no rendirse ante la adversidad.

A Doña Martha, Lourdes, Selvin y a todo el personal de Zamorano

A Zamorano por ser el lugar perfecto donde adquirir carácter, tenacidad y perseverancia.

**AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES
B.A.G.G.**

A la Escuela Agrícola Panamericana “Zamorano”, por haber financiado parcialmente mis estudios de agrónomo.

Al Proyecto de Zamorano-USAID, Componente Leche, y al Instituto Ecuatoriano de Créditos y Becas (IECE) por haber financiado parcialmente mis estudios del programa Ingeniero Agrónomo.

A mis padres, Bolívar González Sotomayor y Albita Granda, por financiar mis estudios de Agronomía e Ingeniería, gracias por su apoyo.

**AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES
A.K.M.M.**

A la fundación Thomas and Virginia scholarship y al Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador por haber financiado parcialmente mis estudios de Agronomía.

A mis padres, Rosario Molina y Héctor Muñoz, por financiar mis estudios de Agrónomo e Ingeniería.

RESUMEN

González, B; Muñoz, A. 2002. Determinación de la calidad biológica del semen congelado de la unidad de ganado lechero y doble propósito en Zamorano, Honduras. Proyecto Especial del programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 33 p.

El objetivo principal del estudio fue determinar la calidad biológica del semen congelado usado en los programas de inseminación artificial en los hatos puro y encastado de la Zamoempresa de Lácteos y Cárnicos. Se realizaron 86 determinaciones del semen congelado de las centrales de inseminación artificial RAB[®], CRI[®], Accelerated Genetics[®] y Semex[®]. Las pajuelas de los toros (32) de las razas AFS (Australian Fresian Sahiwal), AMZ (Australian Milking Zebu), Holstein, Jersey y Pardo Suizo, se escogieron al azar y las variables analizadas fueron motilidad masiva e individual (%), concentración (millones espermatozoides/dosis), morfología (anormalidades primarias y secundarias en porcentaje) y calidad (número de espermatozoides viables al descongelado). Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), donde se compararon razas, casas comerciales y sementales, con un nivel de significancia de 0.05. Las razas con más espermatozoides por dosis fueron: AMZ y AFS (58.8×10^6 , 55.2×10^6 , respectivamente), no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre razas para las variables motilidad ni pH. Para las casas comerciales sólo la concentración de semen mostró diferencias ($P < 0.0009$), siendo RAB[®] la de mayor porcentaje (49.5×10^6 espermatozoides/dosis). Entre sementales se encontraron diferencias ($P < 0.0001$), para todas las variables evaluadas, Wacol2 de la raza AFS, fue el semental que obtuvo la mayor concentración (71.3×10^6) y Blitzzen de la raza Holstein, el semental el de mejor movimiento rectilíneo (63%). Para la calidad se encontraron diferencias ($P < 0.0074$) entre razas, casas comerciales y sementales siendo las mejores AFS (23.9×10^6), RAB[®] (18.9×10^6) y Wacol2 (32.5×10^6), respectivamente. La anormalidad primaria con mayor frecuencia fue la presencia de corpúsculo protoplasmático en la cola, y entre la secundaria la cola flexionada fue la que predominó. Todos los sementales están dentro del rango de calidad (espermatozoides con motilidad adecuada) para una fertilidad aceptable. Se recomienda estudiar la relación entre la fertilidad de las vacas inseminadas y la calidad biológica del semen de cada semental.

Palabras clave: Anormalidades del semen, calidad, concentración, evaluación biológica, fertilidad, inseminación artificial.

NOTA DE PRENSA

Evaluación del semen, una herramienta que debe acompañar a un buen programa de inseminación artificial

Muchos de los productores que utilizan la inseminación artificial cuando baja la fertilidad de su hato atribuyen la mayoría de sus problemas a las vacas en producción; sin considerar también la calidad de semen que utilizan dentro de la explotación. Una reducción en el nivel de nitrógeno líquido del termo de almacenamiento por debajo del mínimo requerido, así como un manejo deficiente de las dosis de semen durante su almacenamiento, transporte o aplicación podrían afectar la calidad del semen, reflejándose en una baja fertilidad del hato.

Considerando lo anterior, en Zamorano se realizó un estudio para evaluar la calidad del semen utilizado en sus explotaciones, tanto para leche como la de doble propósito, donde se encontró que la raza Australian Friesian Sahiwal (AFS), la casa comercial RAB[®] de Australia y el toro Wacol de la misma central de inseminación, fueron las mejores en cuanto a calidad.

Entre los 32 sementales evaluados en el estudio, ninguno mostró niveles por debajo de los rangos de calidad recomendados para una fertilidad aceptable. Sin embargo se recomienda realizar una evaluación para determinar la calidad en cada lote de semen introducido en la explotación, con la finalidad de maximizar la fertilidad.

Lcda. Sobeyda Álvarez

CONTENIDO

	Portadillas.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimientos a patrocinadores.....	vii
	Resumen.....	viii
	Nota de prensa.....	ix
	Contenido.....	x
	Índice de Cuadros.....	xii
	Índice de Anexos.....	xiv
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1	LOCALIZACIÓN.....	6
2.2	MATERIAL Y SEMINAL.....	6
2.3	METODOLOGÍAS.....	6
2.3.1	Preparación de materiales de laboratorio.....	6
2.3.2	Descongelamiento.....	7
2.3.3	Evaluación del semen.....	7
2.3.3.1	Motilidad.....	7
2.3.3.2	Concentración.....	8
2.3.3.3	Morfología.....	9
2.3.3.4	pH.....	10
2.4	VARIABLES ANALIZADAS.....	10
2.5	DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	10
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
3.1	RAZA.....	11
3.1.1	Concentración.....	11
3.1.2	pH.....	11
3.1.3	Movimiento de los espermatozoides.....	11
3.2	CASA COMERCIAL.....	12
3.2.1	Concentración.....	12
3.2.2	pH.....	12
3.2.3	Movimiento de los espermatozoides.....	13
3.3	SEMENTALES.....	14
3.3.1	Concentración.....	14
3.3.2	pH.....	14
3.3.3	Movimiento de los espermatozoides.....	14

3.4	CALIDAD	19
3.4.1	Raza.....	19
3.4.2	Casas comerciales.....	19
3.4.3	Sementales.....	21
3.5	MORFOLOGÍA	21
3.5.1	Razas.....	21
3.5.2	Casas comerciales.....	21
3.5.3	Sementales.....	22
3.6	PRINCIPALES ANORMALIDADES PRIMARIAS	23
3.6.1	Razas.....	23
3.6.2	Casas comerciales.....	23
3.7	PRINCIPALES ANORMALIDADES SECUNDARIAS	24
3.7.1	Razas.....	24
3.7.2	Casas Comerciales.....	24
4.	CONCLUSIONES	27
5.	RECOMENDACIONES	28
6.	BIBLIOGRAFÍA	29
7.	ANEXOS	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Escalas numéricas y descriptivas para determinar el modelo de ondas microscópicas del semen de toro para el movimiento masivo.....	8
2.	Categorización de la calidad de semen bovino.....	10
3.	Comparación de medias entre razas en las siete variables estudiadas.....	12
4.	Comparación de medias entre casas comerciales en las siete variables estudiadas.....	13
5.	Comparación de medias entre toros de las siete variables estudiadas.....	15
6.	Evaluación de la calidad de semen descongelado por raza.....	19
7.	Evaluación de la calidad de semen descongelado por casa comercial.....	20
8.	Comparación de la calidad semen descongelado entre sementales.....	20
9.	Porcentajes de anormalidades primarias y secundarias entre razas.....	21
10.	Porcentajes de anormalidades primarias y secundarias entre casas comerciales.....	22
11.	Porcentajes de anormalidades primarias y secundarias entre sementales.....	22
12.	Comparación entre razas de las principales anormalidades primarias en porcentaje.....	25
13.	Comparación entre casas comerciales de las principales anormalidades primarias en porcentaje.....	25

14.	Comparación entre razas de las principales anomalías secundarias en porcentaje.....	26
15.	Comparación entre casas comerciales de las principales anomalías secundarias en porcentaje.....	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Presentaciones comerciales y grados de dilución de semen bovino.....	31
2.	Hoja de evaluación de semen descongelado.....	32
3.	Lista de toros evaluados y sus determinaciones.....	33

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 30 años en la sección de ganado lechero y doble propósito se ha utilizado la Inseminación Artificial (I.A.) como la principal herramienta para el mejoramiento del hato.

Para que la I.A. sea exitosa debe ser empleada correctamente junto con semen de buena calidad. Esta característica es evaluada por las casas comerciales, asegurando así niveles de fertilidad adecuados, que cumplen con los requisitos mínimos establecidos por el Programa de Servicio de Certificación de Semen (CSS).

Cuando se congela el semen, éste sufre un deterioro en la membrana plasmática y en su acrosoma a causa del proceso de congelación, reduciendo directamente la motilidad individual cuando se evalúa el semen pos-congelación (Soto, 2001).

Pulido (1997), afirma que un manejo deficiente de las dosis de semen durante su almacenamiento, transporte o aplicación puede afectar parcial o totalmente el potencial fecundante, por lo que es importante evaluar la calidad después de descongelado el semen.

En su almacenamiento y distribución en las casas comerciales, el semen congelado pasa por tres términos diferentes con nitrógeno líquido. Uno de ellos es el término almacén donde comúnmente se pueden guardar 80000 pajuelas, el segundo es el término distribuidor utilizado para transportar el semen hasta donde se encuentran las haciendas o lugares de distribución, y por último, el término de trabajo que es el que lleva el inseminador en su recorrido por las vaquerías. Todo esto implica cambios continuos de temperatura y niveles de nitrógeno que afectan la viabilidad de los espermatozoides (Pedroso, 1992).

Pulido (1997), recomienda hacer una evaluación de la calidad al descongelado del semen cuando se ha observado o comprobado una disminución considerable en el nivel de fertilidad del programa reproductivo, si se tiene evidencia de una reducción en el nivel de nitrógeno líquido del término de almacenamiento por debajo del mínimo requerido y si se desconoce o desconfía del procesamiento o del manejo a las cuales hayan estado sujetas las dosis de semen previo a su adquisición.

El espermatozoide es una célula flagelada libre, altamente especializada que no crece ni se divide, su morfología es semejante en todas las especies de animales domésticos, básicamente tiene tres partes fundamentales: cabeza, cuello y cola (Pedroso, 1992).

La cabeza está recubierta por el acrosoma *galea capitis* o capuchón cefálico, tiene una función reproductiva importante puesto que sementales que presentan deformidad o desprendimiento del mismo son subfértiles o estériles. El cuello del espermatozoide, un órgano intermediario corto, une la cabeza con el sistema locomotor (cola) y funciona como centro de movimiento del espermatozoide. La cola del espermatozoide es fina y larga, siendo el órgano del movimiento y de metabolismo del mismo (Pedroso, 1992).

Algunos autores como Saacke *et al.* (1988), mencionan que la fertilidad de una dosis de semen congelado para I.A. depende de dos factores: de la calidad del semen y el número de espermatozoides de calidad. Básicamente las dos características seminales para determinar su calidad son la viabilidad y la morfología espermática.

La velocidad del movimiento masivo del espermatozoide está caracterizado por la formación de remolinos (olas espermáticas) que se forman y desaparecen rápidamente. Según la intensidad del movimiento de los remolinos se valoran tanto la densidad como el porcentaje de los espermatozoides y el grado de su actividad (Holy, 1987).

Este movimiento según Soto (2001), depende de tres factores: concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles en progresión lineal y de la velocidad de la progresión de los espermatozoides.

La motilidad progresiva individual es una característica de viabilidad expresada como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico (Soto, 2001). Según Pulido (1997), el espermatozoide normal es aquel que presenta un movimiento recto, progresivo (hacia delante) y rápido, mientras rota sobre su eje longitudinal. Así mismo Saacke *et al.* (1984), expresa que el grado de asociación entre la motilidad progresiva y la fertilidad, medida como porcentaje de no retorno, varía de 0.22 a 0.77 dependiendo de varios factores como son: la población estudiada, los volúmenes de semen utilizados, y los medios de dilución, entre otros.

Por su parte Soto (2001), menciona que la motilidad individual pos-congelación tiene una disminución en promedio de un 30 a 40% en relación a la motilidad individual en el semen fresco; sin embargo hay toros cuyos semen se ve afectado más/menos que el promedio en su motilidad individual pos-congelación, debido a que se ha determinado que la susceptibilidad de la célula al enfriamiento está relacionada con la composición lipídica de la membrana del espermatozoide

Existen otros tipos de movimiento del espermatozoide como el pendular, el cual hace que el esperma se desplace menos rápido, así como los movimientos circulares, vibratorios, hacia atrás o anclados; estos movimientos anormales son productos de alteraciones anatómicas o del medio con el que tiene contacto el espermatozoide (Pulido, 1997).

La estructura morfológica del espermatozoide es una característica vital y su evaluación crítica indica la capacidad de fecundar y, por último, la calidad total del semen. Pudiéndose encontrar dos tipos de anormalidades, las primarias y secundarias (Holy, 1987).

Las anormalidades primarias están dadas como un índice de los trastornos de la espermatogénesis (Zemjanis, 1990). Las diferentes formas incluyen:

- ❖ Anormalidades de la Cabeza:
 - Cabezas gigantes
 - Cabezas pequeñas
 - Cabezas piriformes
 - Cabeza cónica y estrecha
 - Otras desviaciones de forma y tamaño
- ❖ Anormalidades del cuello:
 - Unión del cuello fuera del eje
 - Cuello doble
 - Cuello espiral
 - Otras anormalidades con cuellos deshilachados, granular o hinchado.
- ❖ Anormalidades de la cola
 - Cola enrollada
 - Cola dobles

Las anormalidades secundarias según Zemjanis (1990), se presentan después que se ha completado la espermatogénesis, es decir, después que el espermatozoide abandona los tubos seminíferos. Influencias adversas sobre el semen colectado, como contaminación con orina o agua, exposición a cambios bruscos de temperatura y sustancias químicas, así como manipulaciones mecánicas inapropiadas pueden producir algunas de las siguientes anormalidades :

- ❖ Cabezas normales separadas
- ❖ Separación del capuchón cefálico
- ❖ Presencia de corpúsculo protoplásmico:
 - Proximal: presente en la parte alta del cuello
 - Distal: presente en la parte distal del cuello, a menudo acompañada de flexión de la cola.
- ❖ Colas flexionadas

También se pueden encontrar otras anormalidades tales como (Zemjanis,1990):

- ❖ Espermátidas y espermatoцитos: la presencia de estos en el semen indica grave trastorno de la función testicular.
- ❖ Cabezas de medusa: se forman por fusión de células epiteliales ciliadas del epidídimo e indican graves desórdenes de este órgano.

- ❖ Glóbulos blancos: su presencia indica inflamación purulenta en cualquier parte del tracto genital.
- ❖ Glóbulos rojos: éstos se originan generalmente de lesiones que afectan el pene y membranas libres del prepucio.

Zemjanis (1990), opina que un semen de un toro al que se le ha determinado una fertilidad normal, el número de formas anormales primarias alcanza el 10% sin exceder un 20%. Los corpúsculos proximales no deben estar presentes en más del 2-3% de las células, el límite máximo aceptable de desprendimiento de capuchón cefálico es de 5% y no deben estar presentes más de 25% de colas flexionadas.

De la misma manera Baerden y Fuquay (1982), afirman que tanto el proceso de congelación como de descongelación provocan lesiones o deterioros en el acrosoma de los espermatozoides. El 90% de los acrosomas en semen de buena calidad de toros de razas lecheras están intactos antes de ser congelado, después de ésta, los acrosomas intactos se reducen a 60-65%. En toros de razas de carne, entre 50 a 55% de los acrosomas permanecen intactos después del proceso de congelación.

Lo anteriormente descrito constituye el parámetro de elección para determinar el grado de daño celular que los procedimientos de criopreservación, especialmente bajo condiciones industriales, causan en los espermatozoides.

Rodríguez (2002), menciona reportes que indican que hay una relación significativa entre la motilidad evaluada subjetivamente en lo que respecta a la linealidad del movimiento espermático y la fertilidad en el campo. La evaluación de la morfología espermática es un importante componente del espermiograma, cuya desviación de la normalidad indica la presencia de patologías testiculares o epididimarias. Ésta se usa como indicador de la habilidad de los espermatozoides para sobrellevar los procesos de congelado y descongelado, usando por ejemplo la apariencia de los acrosomas o la presencia de colas dobladas simples para indicar daños a nivel de membrana o del flagelo respectivamente, y de esa manera evitar el uso de semen procesado para IA.

En forma paralela Sullivan y Elliott (1968), afirman que la relación entre la calidad de semen y la fertilidad está basada en el número de espermatozoides de buena viabilidad más que en el porcentaje de espermatozoides en la dosis de inseminación.

Para Pulido (1997), el número mínimo de espermatozoides de calidad al descongelado, para obtener el máximo de fertilidad, está influenciado por varios factores como son: la fertilidad propia del toro y la habilidad del técnico inseminador, por lo que no se puede recomendar una cantidad mínima constante de espermatozoides viable.

Es por esto que las compañías de procesamiento y congelación de semen envasan en cada dosis una cantidad de espermatozoides viables suficientes para que, después del proceso de congelación y descongelación, se logren obtener un mínimo de 10 millones de espermatozoides con la motilidad progresiva adecuada, ya que se considera que para la gran mayoría de toros ésta es la cantidad mínima para alcanzar el máximo de fertilidad, la cual dependerá

de la calidad del eyaculado, de los medios de dilución y de las curvas de enfriamiento y congelación que implementen cada compañía. En términos generales durante el procesamiento de semen hay pérdidas espermáticas de uno a dos tercios del total envasado (Pulido, 1997).

Considerando que la mayoría del semen que utiliza la sección de ganado lechero y doble propósito, con fines de mejoramiento e investigación, es importado sin tener conocimiento acerca de su manejo tanto antes y después del congelamiento, se decidió determinar la calidad biológica pos-descongelación del material seminal bajo las condiciones de Zamorano.

Los objetivos específicos del estudio consistieron en la determinación de la calidad (concentración x % motilidad progresiva) biológica del semen congelado, a su vez determinar las características microscópicas (motilidad en masa e individual, morfología y concentración) y finalmente la determinación del pH pos-descongelado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó entre mayo a julio del presente año en el laboratorio de reproducción animal de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, ubicada en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, localizada en el Valle del Yeguaré (32 km. de Tegucigalpa) a 800msnm, con una precipitación promedio anual de 1100mm.

2.2 MATERIAL SEMINAL

Se realizaron 86 determinaciones (análisis), de las cuales 62 fueron para la casa de inseminación RAB[®] de Australia y 24 determinaciones para CRI[®], Accelerated Genetics[®] de Estados Unidos y Semex[®] de Canadá.

Las pajuelas analizadas fueron de un total de 32 toros; las mismas que se encontraban almacenadas en canastillas en diferentes termos de almacenamiento, con nitrógeno líquido, para su conservación (-196°C).

2.3 METODOLOGÍAS

Para el caso de la casa Australiana se escogieron al azar tres pajuelas en promedio de cada uno de los sementales (semen) presentes en el inventario y una pajuela para el de las casas americanas (Anexo 3).

2.3.1 Preparación de materiales de laboratorio

Todo el material que se usó (tubos Eppendorf, portaobjetos, cubreobjetos, solución salina fisiológica, solución espermicida) dentro del proceso de evaluación se mantuvo a 37°C.

Según Pulido (1997), los factores de manejo que más influyen sobre el porcentaje de espermias móviles al descongelado, durante la evaluación, son el método de descongelación, la temperatura tanto del medio en que se diluyó el semen como de los materiales con los cuales tiene contacto, la magnitud de aumentos que se utilizaron para evaluar la motilidad y la experiencia del evaluador.

2.3.2 Descongelamiento

Para el descongelamiento de las pajuelas de semen se utilizó el protocolo de 21st Century Genetics (2001):

1. Se removió la canastilla de su posición de almacenaje y se levantó hasta el cuello del tubo (3 a 4 pulgadas de la parte superior del cuello del tubo).
2. Se descongeló la pajilla en agua caliente 32°C a 35°C en su unidad descongeladora, sometiéndola por 30 a 40 segundos.
3. Una vez descongelado el semen, se removió la pajuela de su unidad descongeladora, y luego se procedió a identificarla en la hoja de evaluación.
4. Una vez identificado el semen se determinaron las variables a medir las cuales fueron evaluadas a dos niveles, macro y microscópico.

2.3.3 Evaluación del semen

2.3.3.1 Motilidad. El semen descongelado se depositó en un tubo Eppendorf, para posteriormente extraer de éste 20 µl de semen, de los cuales 10µl se colocaron en un extremo del portaobjetos para evaluar el tipo de movimiento masivo de los espermatozoides a 10X (Cuadro 1). Los otros 10 µl se depositaron en un tubo Eppendorf con solución salina, obteniéndose una dilución de 1:4, de ésta se extrajo 10 µl que se colocaron en el otro extremo del portaobjetos con un cubreobjetos, con la finalidad de diferenciar los distintos tipos de movimiento individuales de los espermatozoides y, especialmente, para establecer el porcentaje del movimiento progresivo del semen descongelado en cinco campos diferentes para obtener el promedio de motilidad progresiva, a 40X, encontrándose comúnmente uno o más de los siguientes movimientos (Holy, 1987):

- Movimiento progresivo o rectilíneo
- Movimiento oscilante (el espermatozoide se mueve sin cambiar de lugar).
- Movimiento circular
- Movimiento retroactivo
- Sin movimiento

Cuadro 1. Escalas numéricas y descriptivas para determinar el modelo de ondas microscópicas del semen de toro para el movimiento masivo.

Escala descriptiva	Escala numérica	Aspecto del modelo
Muy pobre	0	No hay ondas, células espermáticas inmóviles
Pobre	1	No hay ondas, células espermáticas móviles
Aceptable	2	Ondas de movimiento apenas perceptible
Bueno	3	Ondas aparentes; movimiento moderado

Fuente: Zemjanis, 1990.

2.3.3.2 Concentración. Para el cálculo de la concentración se utilizó un hemocitómetro (cámara de Neubauer) que consiste en una lámina que tiene dos cámaras de conteo, que tienen 0.1mm de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de 1mm². Este cuadrado central se divide en 25 cuadrados más pequeños; al conocerse la profundidad y el área es posible determinar el número de espermatozoides en un volumen dado, que por lo general para el caso del semen fresco del toro se utiliza un factor de dilución de 1:100 (Soto, 2001). El error promedio de la valoración de los espermatozoides en la cámara contadora es +/- 10% y puede alcanzar hasta 20% (Holy, 1987).

Para ajustarse a las características del hemocitómetro empleado, el factor de dilución utilizado fue de 1:10¹, que se preparó en un tubo Eppendorf, utilizando 90 µl de solución espermicida compuesta de 10% de formaldehído y 90% de cloruro de sodio (NaCl); más 10 µl de semen descongelado.

Una vez llenada la cámara de conteo con 10µl de la dilución, se empezó el conteo cuando los espermatozoides se encontraban en reposo absoluto, con un aumento microscópico de 40X. Se contaron cinco series de 10 cuadros cada una por dos veces y luego se sacó el promedio del conteo que fue multiplicado por el factor de dilución y por el volumen de la pajuela correspondiente.

¹ Herrera, Carlos. 2002. Cálculo de la concentración espermática. Universidad Nacional de Colombia: Centro de Biotecnología bovina, laboratorio de procesamiento de semen.

Se contaron los espermatozoides situados dentro de 10 cuadrados, y las cabezas situadas en los límites derecho e inferior de los cuadrados, sin tomar en cuenta las colas, siendo 100 el número de cuadrados totales contabilizados. La concentración real se obtiene según la siguientes fórmula:

$$\text{NEPD} = \text{NEPML} \times \text{VOLUMEN DE LAS DOSIS}$$

Donde:

NEPD= número de espermatozoides en la dosis

NEPML= NEC x factor de dilución

NEC= número de espermatozoides contados

El factor de dilución depende del volumen de la pajilla, el medio en que ha sido procesado el semen (leche o yema de huevo) y del grado de dilución de los mismos.

El tipo de presentación comercial de semen, varía de una casa comercial a otra en lo que respecta a volumen y al tipo de diluyente empleado. El volumen de la dosis puede variar desde 0.25 ml hasta 1ml, y como diluyentes se usan leche o yema de huevo. Dosis que fueron diluidas en leche necesitan ser diluidas a un grado mayor que los diluidos con yema de huevo debido a los glóbulos grasos que interfieren con la determinación de la motilidad progresiva (Anexo 1).

2.3.3.3 Morfología. La morfología se determinó mediante coloración. Se usó rojo neutro para la morfología y azul de metileno para el acrosoma. El procedimiento es igual para los dos casos y consistieron en (Holey, 1987):

1. Se diluyó el semen en solución salina a razón de 2:20 (180 μ l de solución salina con 20 μ l de semen).
2. Con 10 μ L de la dilución mencionada se elaboraron dos frotis, dejándolos secar por 10 minutos al ambiente.
3. Posteriormente se tiñó el frotis con rojo neutro al 10% y/o azul de metileno al 10%, dejándolo secar por cinco minutos para luego lavar los restos con agua destilada.
4. Se dejó secar en la estufa a 37°C por cinco minutos.
5. Una vez seco el frotis se analizó la morfología en el microscopio a 40X, con el fin de determinar las anomalías primarias y secundarias.

2.3.3.4 pH. Para la determinación del pH, se utilizó papel tornasol, siendo el parámetro normal del semen de 6.2 a 6.8.

2.4 VARIABLES ANALIZADAS

Las variables estudiadas fueron:

- Motilidad masiva (%)
- Motilidad individual (%)
- Concentración (millones espermatozoides/dosis)
- Morfología (anormalidades primarias y secundarias en %)
- Calidad del semen (Concentración × % motilidad progresiva) (Cuadro 2)
- pH

Cuadro 2. Categorización de la calidad de semen bovino

Calidad (espermatozoides viables/paj.)	Categoría
7 500 000	No adecuada
9 000 000	No adecuada
10 500 000	Aprobada
12 000 000	Aprobada
13 500 000	Aprobada
15 000 000	Aprobada

Fuente: Pulido, 1997.

2.5 DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) , en donde se determinaron diferencias entre razas, casas comerciales y entre toros con un nivel de significancia de 0.05, estas diferencias se determinaron usando las diferencias mínimas significativas (LSMeans) del programa estadístico SAS[®] V.8.2002. (Statistical Analysis System; Littell *et al.*, 1991).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables estudiadas fueron comparadas entre razas, casas comerciales y sementales.

3.1 RAZA

3.1.1 Concentración

Las razas con mayor número promedio de espermatozoides por dosis fueron: AMZ y AFS (58.8×10^6 , 55.2×10^6 respectivamente), aunque estadísticamente no presentaron diferencias significativas entre si.

La raza Pardo Suizo tuvo la menor concentración de espermatozoides (35.9×10^6) por dosis, El que fue diferente al de las razas AFS y AMZ (Cuadro 3). Todas las razas sobrepasan los estándares mínimos de concentración, mencionados por Pulido (1997), quien destaca que la mayoría de las compañías de procesamiento y congelación de semen envasan en cada dosis una cantidad conservadora de espermatozoides de 14.5×10^6 en promedio.

3.1.2 pH

Se encontraron que no existen diferencias significativas entre las razas, aunque sus medias sean diferentes, siendo el promedio encontrado de 6.29. Este valor coincide con lo recomendado por Holy (1987), quien sostiene que normalmente el pH del semen de un toro oscila entre 6.2-6.8.

3.1.3 Movimiento de los espermatozoides

Tanto para los movimientos: rectilíneo progresivo, oscilante, circular y sin movimiento no se detectaron diferencias, con un promedio en porcentaje de 47.14, 3.5, 3.2 y 22.8, respectivamente (Cuadro 3). Para el caso del movimiento rectilíneo progresivo, éste sobrepasa ligeramente a lo mencionado por Pulido (1997), de que lo más común es encontrar motilidades rectilíneas progresivas dentro del rango de 25 a 45% en semen pos-descongelado. En lo referente al movimiento masivo, el promedio registrado fue de 2.5, encontrándose dentro de las categorías de aceptable y bueno, según las escalas numéricas y descriptivas del modelo de ondas microscópicas de semen de toro descritas por Zemjanis (1990).

Cuadro 3. Comparación de medias entre razas en las siete variables estudiadas.

Raza	Toros	Concentración (esp./paj.)*10 ⁶ [^]	pH	-----%-----				
				MM	MR	MO	MC	SM
AMZ	2	58.8 ^a	6.4	3	43.9	0.8	0.4	5
AFS	4	55.2 ^a	6.1	2.7	46.2	8.7	4.9	29
Jersey	8	46.7 ^{ac}	6.4	2.8	41.5	1.8	2.9	13.7
Holstein	13	36.2 ^b	6.2	2.4	39.4	3.6	3.7	25.5
Pardo Suizo	5	35.9 ^{bc}	6.2	2.8	44.1	4.6	1.8	29.5
CV%		24.9	0.6	16.5	17.7	92.7	122.7	27.7
R²		0.6	0.9	0.7	0.8	0.7	0.5	0.9

MM= Movimiento masivo MR= Movimiento rectilíneo MO= Movimiento oscilante
 MC= Movimiento circular SM= Sin movimiento ^= espermatozoides por pajuela
^{abc}= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una P≤ 0.05.

3.2 CASA COMERCIAL

3.2.1 Concentración

La casa comercial que presentó la mayor cantidad de espermatozoides por pajilla fue RAB[®] (49.5×10^6), siendo diferente a las demás casas comerciales (Cuadro 4). Todos los promedios están por encima de lo mencionado por Bearden y Fuquay (1982), quienes hablan de un promedio de 14.5×10^6 espermatozoides por dosis comercial.

3.2.2 pH

La media más alta para ésta variable la presentó la casa comercial RAB[®] (6.3), presentando diferencias estadísticas solo con la casa comercial CRI[®] (Cuadro 4). En todas casas comerciales el pH se encuentran por debajo de los parámetros mencionados por Bearden y Fuquay (1982), de 6.5 a 7.0. Contrariamente a lo mencionado por estos autores, Holy (1981), da un rango normal entre 6.2 a 6.8, estando este rango influenciado por las diferentes medios de dilución (yema de huevo o leche descremada) utilizado.

3.2.3 Movimientos de los espermatozoides

Para los movimientos: rectilíneo progresivo, oscilante, circular y sin movimiento no se detectaron diferencias entre las casas comerciales, encontrándose en promedio un porcentaje 45.3, 2.5, 2.1 y 16.8 respectivamente (Cuadro 4). Para el caso del movimiento rectilíneo progresivo, éste supera ligeramente lo mencionado por Pulido (1997), el cual afirma que lo más común es encontrar motilidades rectilíneas progresivas dentro del rango del 25 a 45% en una dosis de semen pos-descongelado. En lo referente al movimiento masivo, el promedio registrado entre casas comerciales fue 2.9 encontrándose dentro de las categorías de aceptable y bueno, según las escalas numéricas y descriptivas del modelo de ondas microscópicas de semen de toro descritas por Zemjanis (1990).

Cuadro 4. Comparación de medias entre casas comerciales en las siete variables estudiadas.

Casa Comercial	Toros	Concentración (esp./paj.)*10 ⁶ [^]	pH	MM	MR	MO	MC	SM
				-----%-----				
RAB [®]	20	48.1 ^a	6.3 ^a	2.4	39.6	3.5	3.6	21.9
CRI [®]	3	35.5 ^b	6 ^b	3	44.8	0.58	0.3	4.3
Accelerated Genetic [®]	5	29.6 ^b	6.2 ^{ab}	2.8	44.6	5.9	3.3	36.2
Semex [®]	4	26.9 ^b	6.2 ^{ab}	3	49.1	2.6	2.9	20.3
CV%		24.7	0.6	17.9	17.5	96.3	123.5	27.9
R²		0.6	0.9	0.7	0.8	0.7	0.5	0.9

MM= Movimiento masivo MR= Movimiento rectilíneo MO= Movimiento oscilante
 MC= Movimiento circular SM= Sin movimiento ^= espermatozoides por pajueta

RAB[®] = Reverira Artificial Breeding, Albury, NSW.

^{ab}= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una P ≤ 0.05.

3.3 SEMENTALES

3.3.1 Concentración

Todos los sementales cumplen con los requerimientos mínimos biológicos que debe presentar una pajilla para I.A 14.5×10^6 de espermatozoides por dosis (Pulido, 1997), aunque se encontrara diferencias significativas entre ellos, siendo Wacol2 de la raza AFS (71.3×10^6) el semental que obtuvo la mayor concentración de espermatozoides por dosis y Sparkle, de la raza Holstein, (17.7×10^6) el de menor concentración (Cuadro 5).

3.3.2 pH

De los 32 sementales evaluados, 12 presentaron diferencias significativas (Cuadro 5) con relación a los demás con medidas por debajo del rango de 6.2 a 6.8 establecido por Holy (1987).

3.3.3 Movimiento del espermatozoide

Para todos los movimientos se detectaron diferencias estadísticas entre toros. Blitzen (63%) fue el semental que mejor movimiento rectilíneo progresivo presentó, muy superior al rango de 25 a 45% reportado por Pulido (1997). Además, este fue estadísticamente diferente con relación a los demás evaluados (Cuadro 5).

En lo referente al movimiento masivo, el promedio registrado fue 2.5 encontrándose dentro de las categorías de aceptable y bueno, según las escalas numéricas y descriptivas del modelo de ondas microscópicas de semen de toro descritas por Zemjanis (1990).

Cuadro 5. Comparación de medias entre toros de las siete variables estudiadas.

Sementales	Raza	Concentración (esp./paj.)*10 ^{6^}	pH	MM	MR	MO	MC	SM
Wacol2	AFS	71.3 ^{ac}	6.2 ^f	3 ^a	46 ^b	5.50 ^{cdefghi}	4.5 ^{bcdefg}	4.0 ^{abc}
Wacol4	AFS	61.5 ^{abcd}	6.4 ^e	3 ^a	46 ^b	0.75 ^{op}	0 ^{ij}	3 ^e
Maluka	AMZ	61 ^{abcd}	6.4 ^{abde}	3 ^a	43.5 ^b	1.25 ^{lmnop}	0.8 ^{fghij}	4.5 ^e
Warrant	J	60.9 ^{abcd}	6.4 ^{abde}	1.5 ^{fg}	41.5 ^b	1.25 ^{lmnop}	0.8 ^{fghij}	6.5 ^e
Grand Finale	J	56.8 ^{bcd}	6.4 ^{bde}	3 ^a	42.6 ^b	1.9 ^{ijklmnop}	3.4 ^{cdefgh}	5.1 ^e
Yulara	AMZ	56.5 ^{cde}	6.4 ^{cg}	3 ^a	44.3 ^b	0.3 ^p	0 ^{ij}	5.5 ^e
Wacol3	AFS	56 ^{de}	6 ^g	2 ^{defg}	42.5 ^b	4 ^{ghijln}	4.5 ^{bcdf}	49 ^{ab}
Venture	J	54.7 ^{de}	6.4 ^{ac}	3 ^a	42.5 ^b	0.5 ^{op}	1.5 ^{defghij}	5.5 ^e
Bartman	J	54.6 ^{de}	6.4 ^{abde}	3 ^a	46 ^b	1 ^{nop}	0.3 ^{hij}	2.8 ^e
Graber	J	51.1 ^{def}	6.4 ^{abde}	2.6 ^{abd}	42.6 ^b	4.6 ^{efhhi}	5.2 ^{bc}	47.6 ^{ab}
Vision	H	50.6 ^{defh}	6 ^g	1.4 ^g	22.4 ^c	0.64 ^{op}	1.7 ^{defghij}	22.2 ^d

MM= Movimiento masivo

MR= Movimiento rectilíneo

MO= Movimiento oscilante

MC= Movimiento circular

SM= Sin movimiento

^= espermatozoides por pajueta

P= Pardo Suizo

H= Holstein

J= Jersey

AMZ= Australian Milking Zebu AFS= Australian Fresian Sahiwal

abcfghijklmnop= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una P≤ 0.05

Continuación...

Cuadro 5. Comparación de medias entre toros de las siete variables estudiadas

Sementales	Raza	Concentración (esp./paj.)*10 ^{6^}	pH	MM	MR	MO	MC	SM
Dragoon	H	49.6 ^{fg hijl}	6.4 ^{abde}	1.8 ^{efg}	19.2 ^c	5.3 ^{defghi}	8 ^a	18.1 ^d
Philmar	H	49 ^{defghj}	6.4 ^{abde}	2.5 ^{abcdef}	42.5 ^b	0.8 ^{op}	1.5 ^{efghij}	5.25 ^e
Dougal	H	45.5 ^{efghj}	6.4 ^{abde}	2.4 ^{abcd}	39.8 ^b	8.6 ^{bc}	4.8 ^{bc}	46.8 ^{ab}
Premium	P	44.2 ^{efghijk}	6.4 ^{de}	3 ^a	44.5 ^b	0.5 ^{op}	0.3 ^{hij}	4.75 ^e
Zebo	H	42.6 ^{efghijkl}	6.0 ^g	3 ^a	45.8 ^b	0.8 ^{op}	0.3 ^{hij}	3.5 ^e
Kenron	H	42.6 ^{efghijkl}	6.4 ^{bed}	2.5 ^{abcde}	42.3 ^b	1.3 ^{lmnop}	0.5 ^{hij}	6 ^e
Jazzman	J	42.1 ^{efghijk}	6.4 ^{bde}	2.8 ^a	38.2 ^b	1 ^{mnop}	4.2 ^{ce}	6.48 ^e
Craftsman	P	39.6 ^{efghijkl}	6.0 ^g	3 ^a	43 ^b	10.5 ^b	2.5 ^{cdefghij}	44 ^{abc}
Luctor	H	39.1 ^{efghijkl}	6.4 ^{bde}	2 ^{bcdefg}	40 ^b	6 ^{cdefgh}	3.5 ^{cdefghij}	50.5 ^a

MM= Movimiento masivo

MR= Movimiento rectilíneo

MO= Movimiento oscilante

MC= Movimiento circular

SM= Sin movimiento

^= espermatozoides por pajueta

P= Pardo Suizo

H= Holstein

J= Jersey

AMZ= Australian Milking Zebu AFS= Australian Fresian Sahiwal

abcfghijklmnop= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una P ≤ 0.05

Continuación...

Cuadro 5. Comparación de medias entre toros de las siete variables estudiadas

Sementales	Raza	Concentración (esp./paj.)*10 ^{6^} [^]	pH	MM	MR	MO	MC	SM
						%		
Joytaker-Et	P	38.5 ^{hijklm}	6.4 ^{bde}	2 ^{defg}	41.5 ^b	4.50 ^{fghi}	2.5 ^{cdefghij}	51.5 ^a
Barbar	H	34.9 ^{ijklm}	6.4 ^g	2.2 ^{bcdef}	48 ^b	3.4 ^{ijln}	4.8 ^{bc}	43.8 ^{abc}
Emory	P	34.8 ^{klmno}	6 ^g	3 ^a	44.5 ^b	0 ^p	0.25 ^{hij}	5.3 ^e
Palamar	H	34.6 ^{klmno}	6.4 ^{abde}	3 ^a	47.5 ^b	0.6 ^{op}	0.9 ^{fghij}	1 ^e
Wacoll	AFS	31.9 ^{klmno}	6.0 ^g	2.6 ^{abd}	49 ^b	19.1 ^a	8.9 ^a	23 ^e
Script-Et	H	29.7 ^{klmnop}	6.4 ^e	3 ^a	44.5 ^b	0.3 ^p	0.3 ^{hij}	4 ^e
Topkick	J	29.2 ^{lmnop}	6 ^g	3 ^a	44.3 ^b	1 ^{lmnop}	0.5 ^{hij}	4.3 ^e

MM= Movimiento masivo

MR= Movimiento rectilíneo

MO= Movimiento oscilante

MC= Movimiento circular

SM= Sin movimiento

^= espermatozoides por pajueta

P= Pardo Suizo

H= Holstein

J= Jersey

AMZ= Australian Milking Zebu

AFS= Australian Fresian Sahiwal

abcfghijklmnop= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una P≤ 0.05

Continuación...

Cuadro 5. Comparación de medias entre toros de las siete variables estudiadas

Sementales	Raza	Concentración	pH	MM	MR	MO	MC	SM
	(esp./paj.)*10 ^{6^A}			-----%-----				
Duncan	J	24 ^{mnop}	6.4 ^{abde}	3 ^a	44.5 ^b	0.3 ^p	0.5 ^{hij}	4.5 ^e
Collection	P	22.3 ^{nop}	6 ^g	3 ^a	47 ^b	7.5 ^{bcdf}	3.5 ^{cdefghij}	42 ^{bc}
Monday	H	21 ^{nop}	6 ^g	3 ^a	44.5 ^b	5 ^{defghi}	5.5 ^{abc}	5 ^{abc}
Blitzen	H	18.7 ^{op}	6 ^g	3 ^a	63 ^a	4.5 ^{fghi}	5.5 ^{abc}	27 ^d
Sparkle-Et	H	17.7 ^p	6.4 ^e	3 ^a	46 ^b	7 ^{cdefg}	7.5 ^{ab}	39.5 ^c
CV%		24.7	0.6	17.7	23.6	99.9	139.4	44.2
R²		0.6	0.8	0.7	0.4	0.6	0.3	0.8

MM= Movimiento masivo

MR= Movimiento rectilíneo

MO= Movimiento oscilante

MC= Movimiento circular

SM= Sin movimiento

^= espermatozoides por pajueta

P= Pardo Suizo

H= Holstein

J= Jersey

AMZ= Australian Milking Zebu

AFS= Australian Fresian Sahiwal

abcfghijklmnop= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una P ≤ 0.05.

3.4 CALIDAD

3.4.1 Raza

Tomando en cuenta los estándares de Pulido (1997) sobre la calidad de semen, todas las razas del estudio cumplieron con la exigencia mínima de concentración de espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea adecuada (10×10^6).

Aún así, cabe destacar que se encontraron diferencias, las razas de mejor calidad, AFS (23.9×10^6) y AMZ (25.8×10^6), difieren de la raza Holstein que tuvo la menor concentración de espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea (14.1×10^6 , Cuadro 6).

3.4.2 Casas comerciales

De igual manera que en la comparación entre razas, se encontraron diferencias estadísticas entre casas comerciales. El promedio de espermatozoides viables por dosis de la central de inseminación RAB[®] fue de 18.9×10^6 , mientras que el de Semex[®] fue de 12.9×10^6 .

Sin embargo todas las centrales están por encima de lo mínimo requerido de espermatozoides con motilidad adecuada mencionada por Soto (2001) y Pulido (1997) de 10×10^6 y 8×10^6 respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 6. Evaluación de la calidad de semen descongelado por raza.

Raza	Toros	Calidad (esp. viables/paj)* $10^{6\wedge}$
AMZ	2	$25.8^a \pm 3.8$
AFS	4	$23.9^a \pm 2.6$
Jersey	8	$20.1^{ab} \pm 1.7$
Pardo Suizo	5	$17.7^{bc} \pm 2.4$
Holstein	13	$14.1^c \pm 1.3$
CV%		30.8
R²		0.6

[^]= espermatozoides viables por pajueta

^{abc}= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una $P \leq 0.05$.

Cuadro 7. Evaluación de la calidad de semen descongelado por casa comercial

Casa Comercial	Toros	Calidad (esp.viables/paj)*10⁶[^]
RAB [®]	20	18.9 ^a ± 1.2
CRI [®]	3	15.9 ^{ab} ± 3.6
Accelerated Genetics [®]	5	13.05 ^b ± 2.8
Semex [®]	4	12.85 ^b ± 1.3
CV%		30.3
R²		0.6

[^]= espermatozoides viables por pajueta

^{ab}= Medias entre columnas con diferente letra difieren entre si a una P ≤ 0.05.

Cuadro 8. Comparación de la calidad de semen descongelado entre sementales

Sementales	Calidad de semen (esp. viables/paj.)*10⁶[^]	Sementales	Calidad de semen esp. viables/paj.)*10⁶[^]
Wacol 2	32.5 ^a	Jazzman	16.7 ^{hijklmno}
Wacol4	28.3 ^{ab}	Barbar	16.5 ^{hijklmnop}
Maluka	26.5 ^{abc}	Palamar	16.4 ^{ijklmnopqs}
Warrant	25.4 ^{abc}	Joytaker	16.1 ^{ijklmnopqs}
Bartman	25.2 ^{abcd}	Luctor	15.7 ^{klmnopqrs}
Yulara	24.9 ^{bcd}	Emory Perot	15.5 ^{lmnopqrst}
Wacol3	23.8 ^{bcdefg}	Wacol1	15.2 ^{lmnopqs}
Venture	23.2 ^{bcdefgj}	Script	13.5 ^{lmnopqrst}
Grand Finale	22.7 ^{bcdfg}	Topkick	12.9 ^{mnopqrst}
Graber	21.8 ^{cdefgijk}	Blitzen	11.8 ^{nopqrst}
Philmar	20.8 ^{cdefghijk}	Duncan	10.7 ^{opqrst}
Premium	19.6 ^{cdefghijklm}	Collection	10.5 ^{pqrst}
Zebo	19.5 ^{cdefghijklm}	Vision	10.37 ^{qrst}
Kenron	17.9 ^{defghijklmno}	Dragoon	9.6 ^{rst}
Dougal	17.8 ^{efghijklmn}	Monday	9.3 st
Craftsman	17.1 ^{fghijklmnop}	Sparkle	8.2 ^t

[^]= espermatozoides viables por pajueta

abcdefghijklmnopqrst= Medias en ambas columnas numéricas no seguidas por la misma letra difieren entre si (P ≤ 0.05).

3.4.3 Sementales

Se determinaron diferencias significativas entre sementales, reportándose que el semental con mejor calidad fue Wacol2 con 32.5×10^6 espermatozoides normales y el de menor calidad fue Sparkle con 8.2×10^6 .

Tres de los 32 sementales evaluados (Dragoon, Monday y Sparkle) no califican con los parámetros mencionados por Pulido (1997), quien considera que para la gran mayoría de toros 10×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea, es la cantidad óptima para alcanzar el máximo de fertilidad (Cuadro 8).

Sin embargo Soto (2001), sostiene que la fertilidad óptima se produce cuando los espermatozoides en movimiento progresivo a descongelación varía entre los 5×10^6 y 15×10^6 ; por lo que según este autor todos los sementales tendrán una fertilidad adecuada.

3.5 MORFOLOGÍA

3.5.1 Razas

AMZ fue la raza con el mayor porcentaje (15.9%) de anomalías primarias, según Zemjanis (1990), para que un semental tenga fertilidad normal, el número de formas anormales primarias puede alcanzar el 10% sin exceder un 20%, mientras que Bearden y Fuquay (1980), mencionan que a porcentajes mayores de 20-25% de anomalías primarias la fertilidad se ve afectada (Cuadro 9).

3.5.2. Casas Comerciales

La casa comercial CRI[®] fue la que registró los menores porcentajes para las anomalías primarias (10.7%) y RAB[®] registró el mayor porcentaje de anomalías de este tipo (11.8%).

Para el caso de las anomalías secundarias las de mayor porcentaje fueron CRI[®] con 22.8% (Cuadro 10).

Cuadro 9. Porcentajes de anomalías primarias y secundarias entre razas

Razas	Toros	Anormalidades (%)	
		Primarias	Secundarias
AFS	4	9.9 ± 2.4	8.2 ± 5.1
AMZ	2	15.9 ± 3.6	12.5 ± 7.5
Jersey	8	15.2 ± 1.8	13.6 ± 3.3
Holstein	13	9.2 ± 1.2	13.5 ± 2.6
Pardo Suizo	5	12.8 ± 2.2	18.9 ± 4.7

Cuadro 10. Porcentajes de anomalías primarias y secundarias entre casas comerciales

Casas Comerciales	Toros	Anormalidades (%)	
		Primarias	Secundarias
RAB [®]	20	11.8 ± 1.2	13.2 ± 1.9
Accelerated Genetics [®]	5	11.1 ± 2.8	11.2 ± 4.7
CRI [®]	3	10.7 ± 3.6	22.8 ± 6.1
Semex [®]	4	13.8 ± 3.1	10.8 ± 5.3

3.5.3 Sementales

El toro que presentó, el mayor porcentaje anomalías primarias y secundarias fue Duncan y Emory, con 29.3 y 43.8% respectivamente (Cuadro 11). El semental que presentó los menores porcentajes para estas anomalías fue Monday (1.8% anomalías secundarias y 5% para las anomalías secundarias). El 97.1% de los sementales analizados cumplen con los requerimientos mencionados por Zemjanis (1990) y Bearden y Fuaquay (1980) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentajes de anomalías primarias y secundarias entre sementales

Sementales	Anormalidades (%)	
	Primarias	Secundarias
Wacol1	6.7 ± 1.9	3.5 ± 3.2
Barbar	7 ± 1.5	7.2 ± 2.5
Dougal	6.9 ± 1.5	6 ± 2.5
Graber	9.6 ± 1.5	6.4 ± 2.5
Wacol2	11.5 ± 2.4	6.5 ± 3.9
Wacol3	4.5 ± 2.4	7.3 ± 3.9
Luctor	10.3 ± 2.4	3.3 ± 3.9
Joytaker-et	16 ± 2.4	21.5 ± 3.9
Craftsman	13.8 ± 2.4	4.8 ± 3.9
Blitzen	9.8 ± 2.4	4.8 ± 3.9
Monday-Et	5 ± 2.4	1.8 ± 3.9
Collection	9.3 ± 2.4	2 ± 3.9
Sparkle-Et	5.5 ± 2.4	7.5 ± 3.9
Venture	15 ± 2.4	12.3 ± 3.9
Jazzman	19.2 ± 1.5	19.1 ± 2.5
Wacol4	17 ± 2.4	15.5 ± 3.9
Yulara	15.3 ± 2.4	13.3 ± 3.9

Continuación...**Cuadro 11.** Porcentajes de anomalías primarias y secundarias entre sementales

Sementales	Anormalidades (%)	
	Primarias	Secundarias
Palamar	6 ± 2.4	17 ± 3.9
Warrant	11.3 ± 2.3	15.3 ± 3.9
Bartman	11.3 ± 2.3	13.5 ± 3.9
Vision	10.9 ± 1.5	24.7 ± 2.5
Dragoon	15.6 ± 1.5	27.9 ± 2.5
Grand Finale	16.3 ± 1.5	18.4 ± 2.5
Keron	12 ± 2.4	23 ± 3.9
Maluka	16.5 ± 2.3	11.8 ± 3.9
Philmar Holiday	8.3 ± 2.3	12 ± 3.9
Premium	11 ± 2.3	22.8 ± 3.9
Emory Perot	14 ± 2.4	43.8 ± 3.9
Duncan Jude	29.3 ± 2.4	13.8 ± 3.9
Script.Et	11 ± 2.4	23.8 ± 3.9
Topkick	9.5 ± 2.3	10.3 ± 3.9
Zebo	8.5 ± 2.4	14.3 ± 3.9

3.6 PRINCIPALES ANORMALIDADES PRIMARIAS**3.6.1 Raza**

De las principales anomalías primarias, la que se presentó con mayor frecuencia fue la presencia de corpúsculo protoplasmático en la cola, siendo AMZ la raza de más alto porcentaje (61.9%) con esta anomalía. Este porcentaje está muy por encima de lo sostenido por Zemjanis (1990), el cual menciona que la presencia de éstos no deben estar en más del 2-3% de los espermatozoides.

Finalmente y de acuerdo a lo mencionado anteriormente, solo la raza Pardo Suizo (3.8%) cumple con lo estipulado (Cuadro 12).

3.6.2 Casas comerciales

La casas comerciales RAB[®] presentó el mayor porcentaje de corpúsculo citoplasmático en la cola (34.2%), concordando con Gadea *et al.* (2002), quien menciona que esta alteración es la más frecuente encontrada y que su presencia indica una falta de adaptación entre la producción espermática y el ritmo de recolección (Cuadro 13).

3.7 PRINCIPALES ANORMALIDADES SECUNDARIAS

3.7.1 Razas

De las anomalías secundarias, la presencia de colas flexionadas fue la que presentó porcentajes más altos. La raza AMZ reportó el porcentaje más elevado (52.4%). Valor que está muy por encima de lo sugerido por Zemjanis (1990), de no más del 25% de las colas flexionadas (Cuadro 14).

3.7.2 Casas comerciales

En promedio de las casas comerciales las colas flexionadas fueron el defecto más abundante con 39.1%, siendo Semex[®] la de mayor porcentaje (47.9%) (Cuadro 15).

Cuadro 12. Comparación entre razas de las principales anomalías primarias en porcentaje.

Razas	Cabeza					Cuello					Cola									
	-----%-----					----%----					-----%-----									
	Gi	Pe	Pi	CyE	De	Uc	Es	En	Do	Ru	Pr	Des	Ab	Ec	Ax	Es	Rt	To	Cc	
AFS	0	6.9	2.8	13.5	0	0.3	2.5	23.0	0.3	9.3	0	8.9	0	0	0	2.8	3.4	0	26.5	
AMZ	0.8	2.3	4.6	1.5	1.5	1.5	0	6.1	0	10.9	0	6.5	0	0.9	0	1.5	0	0	61.9	
Pardo Suizo	0	0	0.5	0.2	0	0	0	3.7	0	0	1.7	0	0	0	0	0	0	0	3.8	
Holstein	1.2	7.3	5.5	10.1	4.3	2.9	0.2	19.1	0.7	6.3	0.6	9.7	0.3	1.1	0	0.2	0.2	0.3	26.3	
Jersey	2.2	6.1	4.7	6.9	3.4	2.4	1.1	10.1	0.1	5.4	0	15	0	2.1	0.2	0.7	0	0	39.6	
Gi= Gigantes	Pi= Piriformes					De= Degeneración					Es= Espiral					Do= Doble				
Pe= Pequeñas	CyE= Cónica y estrecha					Uc= Unión del cuello fuera del eje					En= Enrollada					Ru= Rudimentaria				
Pr= Prolongada	Des= Desarrollo					Ab= Abreviada					Ec= En la Cabeza					Ax= Abaxial				
Rt= Retroposición del cuerpo de la cola						Cc= Presencia de corpúsculo protoplasmático										To= Torsión				

Cuadro 13. Comparación entre casas comerciales de las principales anomalías primarias en porcentaje.

Casa Comercial	Cabeza					Cuello					Cola									
	-----%-----					----%----					-----%-----									
	Gi	Pe	Pi	CyE	De	Uc	Es	En	Do	Ru	Pr	Des	Ab	Ec	Ax	Es	Rt	To	Cc	
Accelerated Genetic®	0	5.4	3.6	5.2	0.4	0	0	34.5	0	6.9	0	9.0	0	0	0	2.7	0	10.1	22.3	
CRI®	1.8	6.3	3.2	2.3	13.1	0	0	4.0	0	16.3	0	19.7	0	0	0	2.3	0	0	31	
RAB®	1.4	6.3	5.0	9.1	3.3	3.4	0.8	15.2	0.6	5.9	0.3	10.3	0.2	2	0.1	1	0.6	0.2	34.2	
Semex®	0.8	2.7	4.2	5.6	0	0.2	0.5	22.8	1	5.4	0	18.9	0	0	0	0	0	0	34	
Gi= Gigantes	Pi= Piriformes					De= Degeneración					Es= Espiral					Do= Doble				
Pe= Pequeñas	CyE= Cónica y estrecha					Uc= Unión del cuello fuera del eje					En= Enrollada					Ru= Rudimentaria				
Pr= Prolongada	Des= Desarrollo					Ab= Abreviada					Ec= En la Cabeza					Ax= Abaxial				
Rt= Retroposición del cuerpo de la cola						Cc= Presencia de corpúsculo protoplasmático										To= Torsión				

Cuadro 14. Comparación entre razas de las principales anomalías secundarias en porcentaje.

Casa Comercial	Cns	Efn	Sc	Cf	Cs	Czs	Rc	Rtx
	-----%-----							
AFS	5.1	0.3	11.2	48.2	9.9	19.7	0.4	5.1
AMZ	18.3	2	5.5	52.4	7.7	0	0.9	11.5
Pardo Suizo	0	0	0.5	1.8	3	2	2.7	0
Holstein	11	0.8	5.3	35	12.9	7.9	13.1	11.5
Jersey	13.3	1.7	7.3	42.1	6.4	0.4	17.5	11.4
Cns= Cabezas normales separadas	Efn= En forma de nudo		Sc= Separación del capuchón cefálico					
Cf= Colas flexionadas	Cs= Cola suelta		Rc= Rotura de la conexión					
Rtx= Retroaxial								

Cuadro 15. Comparación entre casas comerciales de las principales anomalías secundarias en porcentaje.

Casa Comercial	Cns	Efn	Sc	Cf	Cs	Czs	Rc	Rtx
	-----%-----							
Accelerated Genetic [®]	4.5	0	6.3	31.3	29.5	16.6	2.9	9
CRI [®]	27.5	0	1.6	39.9	10.9	0	4.4	15.4
RAB [®]	12.4	1.5	7.3	37.9	10.6	6.5	13.7	9.9
Semex [®]	5.7	0	2.3	47.9	10.8	5.2	6.1	22
Cns= Cabezas normales separadas	Efn= En forma de nudo		Sc= Separación del capuchón cefálico					
Cf= Colas flexionadas	Cs= Cola suelta		Rc= Rotura de la conexión					
Rtx= Retroaxial								

4. CONCLUSIONES

En promedio todas las razas y casas comerciales están dentro del rango mínimo de calidad (espermatozoides con motilidad adecuada) para una fertilidad aceptable.

Los movimientos masivos e individuales fueron similares entre razas y casas comerciales.

Doce de los 32 toros presentaron pH por debajo de los rangos normales.

5. RECOMENDACIONES

Realizar otros estudios con la inclusión de las pruebas de reducción de azul de metileno para determinar el metabolismo, eosina/nigrosina para la diferenciación de los espermatozoides vivos de los muertos y evaluación del acrosoma.

Realizar estudios en los que se relacionen las fertilidades de las vacas inseminadas con cada uno de los sementales estudiados y con la calidad biológica del semen de cada uno de ellos.

Efectuar evaluaciones para cada lote del semen importado a utilizarse en la sección de ganado lechero con la finalidad de comprobar su calidad.

6. BIBLIOGRAFÍA

Bearden, H.; Fuquay, J. 1982. Reproducción animal aplicada. Editorial El manual moderno. México, México. 45 p.

21st Century Genetics. 2001. Un curso práctico en inseminación artificial. Columbia, Estados Unidos. 33 p.

Gadea, J.; Sellés., E.; Nombela, A.; Romar, R.; Matás, C.; Ruiz, S.; 2002. Evaluación microscópica de la morfología espermática (on line). Accesado 27 Julio 2002. Disponible en <http://www.veterinaria.org/asociaciones/aevedi/00131CV.htm>

Holy, L. 1987. Biología de la reproducción bovina : Introducción al proceso del examen de fertilidad de la hembra y del macho. Ed. Ricardo Barnet Freixas. 2a. ed. La Habana, Cuba, Editorial Científico-Técnica. p. 283-333

Littell, R; Freund, R; Spector, P. 1991. SAS® Series in statistical applications. Cary NC: SAS Institute Inc. 329 p.

Pedroso, I. 1992. Reproducción zootécnica del macho. La Habana, Cuba. Ediciones ENPES. 272 p.

Pulido, J. 1997. Memorias del VI curso de Actualización en reproducción animal: Determinación de la calidad biológica del semen congelado. Tabasco, México. p. 25-31

Rodríguez, H. 2002. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad (on line). Accesado 28 abril 2002. Disponible en www.ivis.org/advances/Repro_Chenoweth/Rodriguez_Martinez_es/capter_farm.asp

Saacke, R.; Nebel, R.; Karabinus, D.; Bame, J.; Mullins, J. 1988. Sperm transport and accesory sperm evaluation: Proceedings of the twelfth technical conference on artificial insemination and reproduction. USA. 15 p.

Saacke, R.; Nebel, R.; Karabinus, D.; Bame, J.; Mullins, J. 1984. Semen quality, importance of and influencing factors: Proceedings of the twelfth technical conference on artificial insemination and reproduction. USA. 10 p.

Soto C., H.E. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y post-congelación en machos bovinos. En: Reproducción Bovina C. González-Staganano (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo, Venezuela. Cap. XV. p. 251-262.

Sullivan, J.; Elliot, J. 1968. Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination: VI Congreso Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial. Paris, Francia. p 2:1307

Zemjanis, R. 1990. Reproducción animal: Diagnóstico y técnicas terapéuticas. México D.F., México. Editorial LIMUSA. 253 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Presentaciones comerciales y grados de dilución de semen bovino

Presentación	Grado de dilución	
	Yema de huevo	Leche
Pajilla 0.5 ml	1:20	1:40
Pajilla 0.25 ml	1:40	1:80
Ampolleta 1 ml	1:10	1:20

Fuente: Pulido, 1997.

Anexo 2. Hoja de evaluación del semen descongelado

EVALUACION DE SEMEN DESCONGELADO

FECHA : _____ PRESENTACION PAJUELA (ml): _____
 NOMBRE: _____ CODIGO: _____ RAZA: _____ GRADO DE DILUCION: _____

Nivel Macroscopico

Ph	6.2 - 6.8
-----------	------------------

Nivel Microscopico

Tipos de Movimientos

Masivo	3
---------------	----------

*Escalas numéricas y descriptivas para determinar el modelo de ondas microscópicas del semen de toro.

ESCALA DESCRIPTIVA	ESCALA NUMERICA	ASPECTO DEL MODELO
Muy pobre	0	No hay ondas, células espermáticas inmóviles
Pobre	1	No hay ondas, células espermáticas móviles
Aceptable	2	Ondas de movimiento apenas perceptible
Bueno	3	Ondas aparentes; movimiento moderado

Individual	1	2	3	4	5	
Rectilíneo						Normal
Oscilante						
Circular						
Retroactivo						
Sin Movimiento						

*Escalas numéricas y descriptivas para determinar la motilidad de ondas microscópicas del semen de toro.

CELULAS MÓVILES %	VALOR NUMERICO	VALOR DESCRIPTIVO
46-50	3	Muy bueno
21-45	2	Bueno
0-20	1	Pobre

Concentración	10⁹ x 10⁶
----------------------	----------------------------------------

Morfología de espermatozoides

*Anormalidades primarias testiculares

De la Cabeza	Del cuello	De la Cola
Cabezas gigantes	Unión del cuello fuera del eje	Cola enrollada
Cabezas pequeñas	Cuello doble	Col doble
Cabezas piriformes	Cuello espiral	Rudimentaria
Cabeza cónica y estrecha	Retroaxial	Desarrollo
Degeneración	Ninguna	Ninguna

*Anormalidades secundarias y células extrañas

Cabezas normales separadas	Separación del capuchón cefálico	Presencia de corpúsculo protoplásmico	Colas flexionadas
Ninguna	Ninguna	Ninguna	Colas sueltas

Anexo 3. Lista de toros evaluados y sus determinaciones

Número	Toro	Código	Raza	Casa Comercial	No. Pajuelas analizadas	No. Determinaciones/pajuela
1	Wacol1	G394-92.008	AFS	RAB	3	3
2	Barbar	29FFL14	Holstein	RAB	5	5
3	Dougal	29FFM21	Holstein	RAB	5	5
4	Graber	29JJP06	Jersey	RAB	5	5
6	Walco2	15FSH03-H108	AFS	RAB	2	2
7	Walco3	15FSG06-G369	AFS	RAB	2	2
8	Luctor	RAB 13FFH11	Holstein	RAB	2	2
9	Joytaker-et	14B0236	Pardo Suizo	Accelerated Genetics	1	2
10	Craftsman	14B0190	Pardo Suizo	Accelerated Genetics	1	2
11	Blitzen	073H02895	Holstein	Semex	1	2
12	Monday-Et	073H02832	Holstein	Semex	1	2
13	Collection	14BS0244	Pardo Suizo	Accelerated Genetics	1	2
14	Sparkle-Et	14H02240	Holstein	Accelerated Genetics	1	2
15	Venture	29JJM01	Jersey	RAB	2	2
16	Jazzman	29JJN05	Jersey	RAB	5	5
17	Wacol4	15SJ37	AFS	RAB	2	2
18	Yulara	50-1346	AMZ	RAB	2	2
19	Palamar	29FFJ33	Holstein	RAB	2	2
20	Warrant	29JJN02	Jersey	RAB	2	2
21	Bartman	29JJP03	Jersey	RAB	2	2
22	Vision	29FFN36	Holstein	RAB	5	5
23	Dragoon	29FFP66	Holstein	RAB	5	5
24	Grand Finale	29JJN03	Jersey	RAB	5	5
25	Kenron Inst.	23FFF36	Holstein	RAB	2	2
26	Maluka	50-1319	AMZ	RAB	2	2
27	Philmar Holiday	29FFM34	Holstein	RAB	2	2
28	Premium	UO54B282	Pardo Suizo	Semex	1	2
29	Emory Perot	189032	Pardo Suizo	CRI	1	2
30	Dunca Jude	071JE0107	Jersey	Semex	1	2
31	Script-Et	14H1232	Holstein	Accelerated Genetics	1	2
32	Topkick	1JE317	Jersey	CRI	1	2
33	Zebo	1HO967	Holstein	CRI	1	2
				Total	74	86